



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) 324412

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 5/06 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

C07K 14/485 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 35/12 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19951617	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1993.10.27 PCT/CA93/00456
(22)	Inng.dag	1995.04.27	(85)	Videreføringdag	1995.04.27
(24)	Løpedag	1993.10.27	(30)	Prioritet	1992.10.28, US, 967622
(41)	Alm.tilgj	1995.04.27			
(45)	Meddelt	2007.10.08			
(73)	Innehaver	Neurospheres Holdings Ltd, 3330 Hospital Drive N.W., 83 Heritage Medical Research Building, Calgary, AB T2N 4N1, CA			
(72)	Oppfinner	Samuel Weiss, Calgary, AB, CA Brent A. Reynolds, Calgary, AB, CA Joseph P. Hammang, Barrington, RI, US Edward E Baetge, Providence, RI, US			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO			

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for fremstilling av differensierte celler fra pattedyrnervestamceller			
(56)	Anførte publikasjoner	Cattaneo and McKay, Nature, vol 347, 25 oktober 1990 Kitani et al, 1991, In Vitro Cell Dev Biol, 27A: 615-624 Murphy et al, Journal of neuroscience research, 25:463-475 (1990) Mytilineou et al, 20.januar, 1992, Neuroscience Letters, 135:62-66 Reynolds & Weiss, July 1992, Restorative Neurology and neuroscience, 4. 208, Reynolds and Weiss, Science, vol 255, 1992 WO 9301275/ NO 940056,			
(57)	Sammendrag				

Fremgangsmåter for å øke antallet neural stamceller som differensierer til astrocyter, oligodendrocyter eller neuroner er beskrevet. De omfatter proliferering av Isolerte neural stamceller i et kulturmedium med en første vekstfaktor for å danne forløperceller. Forløpercellene blir deretter differensiert i astrocyter, oligodendrocyter eller neuroner i et andre kulturmedium, fri for første vekstfaktor, inneholdende en andre vekstfaktor eller kombinasjon av vekstfaktorer.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av differensierte celler fra pattedyrnervestamceller.

5 En fremgangsmåte for preparering av differensierte celler fra forløperceller er beskrevet hvor de isolerte neural stamcellene blir proliferert, *in vitro*, i kulturmedium inneholdende en vekstfaktor som induserer produksjonen av forløpercellene. Forløpercellene blir deretter differensiert i et andre kulturmedium med en andre vekstfaktor eller kombinasjon av vekstfaktorer (Cattaneo and McKay, Nature, vol. 347, 1990). Den vesentlige fenotypen til de differensierte cellene er avhengig av seleksjon av 10 den andre vekstfaktor eller de andre vekstfaktorer.

Utviklingen av nervesystemet begynner i et tidlig stadium av den føtale utviklingen. Neurogenese, dannelse av nye neuroner, er fullført tidlig i postnatalperioden. Synaptiske koblinger som er involvert i neuralkretser blir kontinuerlig endret i løpet av individets 15 levetid på grunn av synaptisk plastisitet og celledød.

Det første trinnet i neuralutviklingen er celledannelse, som er den nøyaktige temporale og romlige rekkefølgen hvor forløperen eller progenitorcellene prolifererer og differensierer. Prolifererende celler vil gi opphav til neuroblaster, glioblaster og stamceller. 20

FGF er tidligere blitt beskrevet å stimulere proliferering og differensiering av neuralforløperceller *in vitro* (Murphy et al, Journal of Neuroscience Research, 25:463-475). Videre er det også tidligere beskrevet proliferering og differensiering av neurale celler avledet fra mus, hvor nevnte celler kan differensiere til astrocytter og neuroner, 25 men ikke til oligodendrocytter (Kitani et al, 1991, In Vitro Cell Dev Biol, 27A:615-624). Det er også kjent at neurale forløperceller kan prolifereres i et medium inneholdende EGF, og at disse cellene kan differensieres til neuroner og astrocytter, men ikke til oligodendrocytter, ved etterfølgende kultivering i et medium fritt for EGF (Mytilineou et al, 1992, Neuroscience Letters, 135:62-66). 30

Det andre trinnet er en periode med celletype differensiering og migrering når forløpercellene blir neuroner og gliaceller og migrerer til deres endelige posisjoner. Celler som er avledet fra nerverøret (tube) gir opphav til neuroner og gliaceller i sentralnervesystemet (CNS), mens celler avledet fra neural crest gir opphav til celler i 35 det perifere nervesystemet (PNS). Visse faktorerer til stede under utviklingen, så som nervevekstfaktor (NGF), fremmer veksten av neuralceller. NGF blir utskilt av cellene i neural crest og stimulerer utvekst og vekst av neural aksoner.

Det tredje trinnet i utviklingen oppstår når celler erverver spesifikke fenotypiske kvaliteter, så som ekspresjon av spesielle neurotransmittere. Ved dette tidspunktet sender neuronene også utløpere som danner synapser med sine mål. Neuroner blir ikke
5 delte etter differensieringen.

Selektiv celledød oppstår hvor degenerasjon og død av spesifikke celler, fibere og synaptiske koblinger fininnstiller det omfattende kretssystemet i nervesystemet. Denne fininnstillingen fortsetter i løpet av vertens liv. Senere i livet kan selektiv degenerasjon
10 forårsaket av aldring, infeksjon og andre ukjente etiologier føre til neurodegenerative sykdommer.

Nylig har konseptet med neurologisk vevspodning blitt anvendt for behandling av neurologiske sykdommer så som Parkinsons sykdom. Neuralpodninger kan føre til at
15 det ikke lenger er behov for konstant medikamentadministrering, og også at det ikke er behov for kompliserte medikamentleveringssystemer som er nødvendig på grunn av blod-hjerne barrieren. Det er derimot begrensninger i denne teknikken. For det første kan celler anvendt for transplantasjon som bærer celleoverflate molekyler til en differensiert celle fra en annen vert inducere immunreaksjoner hos verten. I tillegg må
20 cellene være i et stadium av utviklingen hvor de har evne til å danne normale neuralkoblinger med nær liggende celler. På grunn av dette har de innledende studiene på neurotransplantasjon vært sentrert rundt anvendelse av føtale celler. Perlow et al., beskriver transplantasjon av føtale dopaminerge neuroner til voksne rotter som kjemisk inducerer nigrostriatallesjoner i "Brain grafts reduce motor abnormalities produced by
25 destruction of nigrostriatal dopamine system," *Science* 204:643-647 (1979). Disse podningene har vist god overlevelse, aksonal utvekst og signifikant redusert bevegelsesfeil hos vertedyr. Lindvall et al., i "Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's Disease," *Science* 257:574:577 (1999), viste at neural transplantasjon av humane føtale mesencefaliske dopaminneuroner kan
30 gjenopprette dopaminsyntesen og lagringen, og redusere rigiditeten og bradykinesi hos pasienter som lider av Parkinsons sykdom. Freed, et al., i "Transplantation in human fetal dopamine cells for Parkinson's Disease," *Arch. Neurol.* 47:505-512 (1990) har også vist forbedring hos en pasient som fikk tilført et føtalt transplantat.

35 Ovennevnte referanser beskriver at føtalt hjernevev fra pattedyr har gode overlevelsesmuligheter ved øyeblikkelig transplantasjon. Den økte evnen til overlevelse av føtale neuroner antas å være forårsaket av den reduserte mottageligheten som føtale

neuroner har overfor anoksi enn voksne neuroner, og også på grunn av mangel på celleoverflatemarkører hos føtale celler hvor tilstedeværelsen kan føre til avstøting av transplantert vev fra voksne. Til tross for at hjernen anses som et immunologisk privilegert område kan en viss avstøtning av føtalt vev oppstå. Muligheten for å anvende føtalt vev er derfor begrenset, ikke bare på grunn av avstøtning av føtale vev isolert fra en annen vert, og på grunn av det derved oppståtte behovet for immunsuppressive medikamenter, men også på grunn av etiske problemer ved anskaffelse av føtale vev. Neonatalhjernevev har begrenset kapasitet for overlevelse og CNS neuroner fra voksne pattedyr overlever generelt ikke transplantasjon til hjernen.

5

10 Til tross for at CNS neuroner fra voksne ikke er gode kandidater for neurotransplantasjon har neuroner fra perifert nervesystem (PNS) fra voksne blitt vist å overleve transplantasjon, og å utøve neurotrofiske og gliotrofiske virkninger på utvikling av vertens neural vev. En kilde for ikke-CNS neural vev for transplantasjon er binyremarg. Adrenale kromaffine celler stammer fra neural cresten slik som PNS

15 neuroner, og mottar synapser og produserer bærere og enzymproteiner som ligner PNS neuroner. Til tross for at disse cellene fungerer på en endokrin måte i intakt adrenal medulla så mister disse cellene i kultur deres kjertel fenotype og utvikler neuraltrekk i kultur i nærvær av visse vekstfaktorer og hormoner (Notter, et al., "Neuronal properties of monkey adrenal medulla in vitro," *Cell Tissue Research* 244:69-76 (1986)). Når

20 podet inn i pattedyr CNS overlever disse cellene og syntetiserer betraktelige mengder dopamin som kan reagere med dopaminreseptorer i naboliggende områder av CNS.

I US-PS 4.980.174, fører transplantasjon av monoamin-inneholdende celler isolert fra pinealkjertelen og binyremarg hos voksne rotter inn i frontal cortex hos rotter til bedring av tillært hjelpeløshet, en form for depresjon hos verten. I US-PS 4.753.635 ble kromaffine celler og binyremargvev avledet fra stuter implantert inn i hjernestammen eller ryggmargen til rotter og medførte smertestillelse når implantert vev eller celle ble indusert til å frigi nociceptor interreagerende forbindelser (dvs. catecholaminer så som dopamin). Binyremargceller er blitt autologt podet inn i mennesker, og har overlevd, og

30 ført til svak til moderat forbedring i symptomene (Watts, et al., "Adrenal-caudate transplantation in patients with Parkinson's Disease (PD): 1-year follow-up", *Neurology* 39 Suppl. 1:127 (1989); Hurtig et al., "Post-mortem analysis of adrenal-medulla-to-caudate autograft in a patient with Parkinson's Disease," *Annals of Neurology* 25:607-614 [1989]. Adrenalceller oppnår derimot ikke en normal neural fenotype, og

35 har derfor begrenset anvendelse som transplantat når synaptiske koblinger må bli dannet.

En annen vevskilde for neurotransplantasjon er fra cellelinjer. Cellelinjer er udødeliggjorte celler som enten kommer fra transformasjon av normale celler med et onkogen (Cepko, "Immortalization of neural cells via retrovirus-mediated oncogene transduction," *Ann. Rev. Neurosci.* 12:47-65 (1989) eller ved dyrking av celler med endrede vekstkaraktertrekk in vitro (Ronnett, et al., "Human cortical neuronal cell line: Establishment from a patient with unilateral megalencephaly," *Science* 248:603-605 (1990)). Slike celler kan bli dyrket i kultur i store mengder for så å anvendes ved mange transplantasjoner. Noen cellelinjer er blitt vist å differensiere ved kjemisk behandling for å uttrykke forskjellige neuronal egenskaper så som neurittdannelse, eksiterbare membraner og syntese av neurotransmittere og reseptorer derav. Ved differensiering fremstår disse cellene å være amitotiske og derfor ikke-cancerøse. Potensialet disse cellene har til å indusere skadelige immunresponser, anvendelse av retrovirus for å udødeliggjøre celler, potensiale for å reversere disse cellene til en amitotisk tilstand og mangel på respons som disse cellene har for normal vekst-inhiberende signaler gjør cellelinjene mindre enn optimale for utstrakt bruk.

O-2A celler er gliaforløperceller som gir opphav in vitro bare til oligodendrocytter og type II astrocytter. Celler som ved immunfarging in vivo fremstår som O-2A fenotyper er blitt vist å remyelinere demyelinerte neuroner in vivo. Godfraind et al., *J. Cell Biol.* 109:2405-2416 (1989). Injeksjon av et stort antall O-2A celler er nødvendig for tilstrekkelig å remyelinere alle målneuronene in vivo, i det det ser ut som om O-2A celler (som andre gliacellepreparater) ikke fortsetter å bli delt in situ. Til tross for at O-2A forløpercellene kan bli dyrket i kultur anvender den for tiden eneste tilgjengelige isoleringsteknikken optisk nerve som utgangsmateriale. Dette er en kilde med lavt utbytte som krever et antall rensningstrinn. Det er en ytterligere ulempe at O-2A cellene isolert ved de tilgjengelige prosedyrene bare har evne til et begrenset antall delinger. Raff *Science* 243:1450-1455 (1989).

Transformerte O-2A cellelinjer er uegnede for transplantasjon på grunn av det faktumet at transformasjonsprosessen fører til en genetisk (onkogen) kontrollert celledeling i motsetning til primære cellelinjer eller neural stem- eller forløperceller hvor reguleringen av delingen er i et epigenetisk nivå. Ytterligere potensielle problemer innbefatter manglende stabilitet av cellelinjene over lange tidsperioder, og fravikende mønstre på differensiering eller responser for vekstfaktorer. Goldman *Trends Neuro. Sci.* 15:359-362 (1992).

Den manglende evnen i tidligere teknikk for at transplantatet fullstendig integrerer inn i

vertsvevet, og den manglende tilgjengeligheten av celler i ubegrensede mengder fra en pålitelig kilde for podning er kanskje de største begrensningene til neurotransplantasjon.

5 I lys av ovennevnte mangler ved tidligere metoder for neural celledyrking og transplantasjon så eksisterer det fortsatt et behov innenfor området for en pålitelig kilde med ubegrenset antall celler for neurotransplantasjon som har evne til differensiering til neuroner og gliaceller.

10 Det er derfor en hensikt ifølge oppfinnelse å tilveiebringe en pålitelig kilde for epigenetiske regulerte celler for transplantasjon med evne til differensiering i neuroner og gliaceller.

15 Det er en annen hensikt ifølge oppfinnelsen å tilveiebringe en fremgangsmåte for å influere på differensieringen av forløpercellene ved anvendelse av spesifikke vekstfaktorer. Disse og andre hensikter og trekk ifølge oppfinnelsen vil fremkomme for fagfolk innenfor fagområdet ut fra følgende detaljerte beskrivelse og vedlagte krav.

20 Ingen av de tidligere referansene antas å beskrive foreliggende oppfinnelse og hører ikke inn under tidligere teknikk.

Definisjoner

25 Betegnelsen "stamcelle" refererer til en udifferensiert celle med evne til proliferasjon og som gir opphav til flere stamceller som har evne til å danne et stort antall forløperceller som igjen kan gi opphav til differensierte, eller differensierbare datterceller.

Betegnelsen "neural stamcelle" (NSC) refererer til stamcellene ifølge foreliggende oppfinnelse, hvor avkommet under hensiktsmessige dyrkningsbetingelser, innbefatter både gliale og neuronale forløperceller.

30 Betegnelsen "forløper celler" refererer til udifferensierte celler ifølge foreliggende oppfinnelse, avledet fra neural stamceller, i det avkommet under hensiktsmessige betingelser, innbefatter gliale og/eller neuronale forløperceller.

35 Betegnelsen "oligodendrocytt" refererer til en differensiert gliacelle som danner myelin som omgir aksonene i sentralnervesystemet (CNS). Oligodendrocytter har fenotypen galaktocerebrosid (+), myelin basisk protein (+) og glialt fibrillært surt protein (-) [GalC(+), MBP(+), GFAP(-)].

Betegnelsen "neuron" refererer til en celle som har en fenotype neurospesifikk enolase (+) eller neurofilament (+) [NSE(+) eller NF(+)].

- 5 Betegnelsen "type I astrocytt" refererer til en differensiert gliacelle med en flat protoplasmisk/fibroblast-lignende morfologi som er GFAP(+), A2B5(-), GalC(-) og MBP(-).

- 10 Betegnelsen "type II astrocytt" refererer til en differensiert gliacelle som utviser en stellat prosess-bærende morfologi av fenotype GFAP(+), A2B5(+), GalC(-) og MBP(-).

Betegnelsen "neuronal forløperceller" refererer til celler som produserer datterceller som under hensiktsmessige betingelser blir eller gir opphav til neuroner.

- 15 Betegnelsen "oligodendrocytt forløperceller" refererer til celler som gir opphav til oligodendrocytter. Oligodendrocytt forløpercellene kan ha fenotypen A2B5(+), O4(+)/GalC(-), MBP(-) og GFAP (-) (men er ikke begrenset til denne fenotypen).

- 20 Betegnelsen "neurosfære" refererer til en sammenhopning av celler avledet fra neuralstamceller og dyrket in vitro. I det minste noen av cellene er av nestin (+) fenotype. Sammenhopningen består av stamceller og/eller forløperceller og kan eller behøver ikke å innbefatte differensierte celler.

- 25 Betegnelsen "forløperceller" refererer til levende celler ifølge foreliggende oppfinnelse som stammer fra neural stamceller proliferert i et dyrkningsmedium inneholdende en vekstfaktor eller -faktorer, og innbefatter både forløper- og stamceller. Forløpercellene blir vanligvis dyrket i form av neurosfærer, men kan utvise differensierte vekstmønstre avhengig av kulturbetingelsene.

- 30 Betegnelsen "vekstfaktor" refererer til et protein, peptid eller et annet molekyl som har en vekstfremmende, prolifererende, differensierende eller trofisk effekt.

- 35 Betegnelsen "donor" refererer til mennesket eller dyret som er kilde for de neurale stamcellene som blir anvendt ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

Fenotypiske karaktertrekk

Neurale stamceller (NSC) er blitt rapportert og deres potensielle anvendelse er blitt

beskrevet. (Reynolds og Weiss, *Science* 255:1707 (1992)). Det har blitt vist at NSC gir opphav til neuroblaster (Reynolds og Weiss, *Restorative Neurology & Neuroscience* 4:208 (1992)). Det er ikke kjent at NSC også gir opphav til hovedmakroglia-celletyper (astrocytter og oligodendrocytter).

5

Neuralstamceller kan bli isolert og dyrket ifølge metoden til Reynolds og Weiss (supra). Sistnevnte metode omfatter disseksjon og isolering av postnatale pattedyr neuralvev, etterfulgt av enzymatisk og mekanisk atskillelse for oppnåelse av en celle suspensjon. Denne celle suspensjonen kan deretter kultiveres som beskrevet i de etterfølgende avsnitt. Epidermal vekstfaktor (EGF)-responsive stamceller blir når dyrket i et definert serumfritt medium, og i nærvær av et mitogen så som EGF eller lignende, induert til å dele seg og gir opphav til en sammenhopning av udifferensierte celler.

10

Sammenhopningene av cellene er ikke immunreaktive for GFAP, neurofilament (NF), neurospesifikk enolase (NSE) eller MBP. Forløpercellene innenfor sammenhopningen er derimot immunreaktivt for nestin, et intermediært filamentprotein som finnes i udifferensierte CNS celler. Nestinmarkøren ble karakterisert av Lehdahl et al., *Cell* 60:585-595 (1990), og er inkorporert heri som referanse. De modne fenotypene assosiert med de fire celletypene som kan bli differensiert fra avkommet til forløpercellene er hovedsakelig negative for nestin fenotypen.

20

Ved kontinuerlig tilstedeværelse av et mitogen, så som EGF eller lignende, fortsetter forløpercellene innenfor neurosfærene å dele seg og resulterer i en økning i størrelse av neurosfærer og antallet udifferensierte celler [nestin(+), GFAP(-), NF(-), NSE(-), MBP(-)]. På dette stadiet er cellene ikke-adherente og danner fritt-flytende sammenhopninger som er karakteristisk for neurosfærer. Dyrkningsbetingelsene kan bli variert slik at mens forløpercellene fortsatt uttrykker nestin fenotypen så danner de ikke karaktertrekkene til neurosfærer. Etter fjerning av mitogenet adherer cellene til substratet (poly-ornithin-behandlet plast eller glass), flater ut og begynner å differensiere til neuroner og gliaceller. På dette stadiet kan kulturmediet inneholde serum så som 0,5-1% føtalt bovint serum (FBS). I løpet av 2-3 dager begynner de fleste eller alle forløpercellene å mangle immunreaktivitet for nestin og begynner å uttrykke de intermediære filamenter spesifikke for neuroner eller for astrocytter som vist ved immunreaktiviteten mot henholdsvis NF og GFAP.

25

30

35

Identifikasjon av neuroner blir oppnådd ved anvendelse av immunreaktivitet for neuronspesifikk enolase (NSE) og neurofilament proteinene tau-1 og MAP-2. På grunn av at disse markørene er meget pålitelige vil de fortsatt være nyttige for primær identifikasjon

av neuroner, men neuroner kan også bli identifisert basert på deres spesifikke neurotransmitter fenotype.

5 Ved anvendelse av dual-markør immunfluorescens og immunperoksidasetoder kan differensierte neurosfærekulturer bli analysert for ekspresjon av neurotransmittere, eller i noen tilfeller for enzymer ansvarlig for neurotransmitter syntese. Alternativt kan in situ hybridiseringshistokjemi bli utført ved anvendelse av cDNA- eller RNA-prober spesifikke for peptidneurotransmitter eller neurotransmitter syntetiserende enzym mRNA. Disse teknikkene kan bli kombinert med immunocytokjemiske metoder for å 10 forsterke identifikasjonen av spesifikke fenotyper. Om nødvendig kan antistoffene og molekylære prober angitt ovenfor bli anvendt i Western og Northern blot prosedyrer for å behjelpe celleidentifikasjonen.

15 Alternativt kan høy ytelses væskechromatografi (HPLC) metoder bli anvendt ved fenotype identifikasjon. HPLC er spesielt nyttig for identifikasjon av et antall små peptid neurotransmittere, og catecholamin og indolamin neurotransmittere. Disse teknikkene er meget sensitive og kan bli anvendt i storskala screenings paradigmer som krever relativt små prøvevolum.

20 I tillegg til tilstedeværelse av neuroner og astrocytter begynner et stort antall av celler som ikke uttrykker verken intermediære filamenter spesifikke for neuroner eller for astrocytter, å uttrykke markører spesifikke for oligodendrocytter på en korrekt temporal måte. Cellene blir først immunreaktive for O4 (et celleoverflateantigen), galaktocerebrosid (GalC, et myelin glykolipid) og til slutt, myelin basisk protein (MBP). Disse 25 cellene kan også ha en karakteristisk oligodendrocyttmorfologi.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangsmåte for å influere på den relative andel av disse differensierte celletypene ved tilførsel av eksogene vekstfaktorer under 30 forløpercellenes differensieringsstadium.

Foreliggende oppfinnelse angår således en fremgangsmåte for fremstilling av differensierte celler fra pattedyrnervestamceller, kjennetegnet ved at den omfatter 35 trinnene:

- (a) proliferering av minst en pattedyrnervestamcelle, isolert fra donorvev hvor vevet ikke stammer fra et humant embryo, i suspensjon i et serum-fritt kulturmedium omfattende EGF som et mitogen som prolifererer nevnte minst en stamcelle for

å produsere neurale forløperceller, hvor minst en neural stamcelle responderer på EGF og er i stand til å produsere etterkommere som er i stand til å differensiere til neuroner, astrocytter og oligodendrocytter; og

- 5 (b) differensiering av de neurale forløperceller ved å fjerne mitogenet og dyrking av nevnte neurale forløperceller i et EGF-fritt differensieringsinduserende kulturmedium for å produsere differensierte celler, hvor nevnte medium inneholder et substrat til hvilket de neurale forløperceller kan feste seg, hvor nevnte medium inneholder en eksogen vekstfaktor valgt fra gruppen bestående av CNTF, bFGF, BDNF og retinsyre.

10

I en foretrukken utførelsesform er substratet valgt fra gruppen bestående av poly-L-ornitin, kollagen, fibronectin, laminin og matrigel.

I en foretrukken utførelsesform er de differensierte cellene neuroner.

15

I en foretrukken utførelsesform er de differensierte cellene modne oligodendrocytter.

I en foretrukken utførelsesform er de differensierte cellene astrocytter.

20

Biologiske virkninger av vekst og trofiske faktorer er generelt formidlet gjennom binding til celleoverflate reseptorer. Reseptorene for et antall av disse faktorene er blitt identifisert og antistoffer og molekylære prober for spesifikke reseptorer er tilgjengelige. Neural stamceller kan bli analysert for tilstedeværelse av vekstfaktorreseptorer ved alle differensieringsstadiene. I mange tilfeller vil identifikasjonen av en spesiell reseptor definere strategien som anvendes i ytterligere differensiering av celler langs spesifikke utviklingsveier ved tilsetning av eksogen vekst eller trofiske faktorer.

25

30

Eksogene vekstfaktorer kan bli tilsatt alene eller i forskjellige kombinasjoner. De kan også bli tilsatt i en temporal sekvens (dvs. eksponering for en første vekstfaktor innvirke på ekspresjonen av en andre vekstfaktorreseptor, Neuron 4: 189-201 (1990). Blant vekstfaktorer og andre molekyler som kan bli anvendt for å innvirke på differensieringen av forløpercellene in vitro er sur og basisk fibroblastvekstfaktor (aFGF & bFGF), ciliær neurotrofisk faktor (CNTF), nervefaktor (NGF), hjerne-avledet neurotrofisk faktor (BDNF), neurotrofin 3 (NT3), neurotrofin 4 (NT4), interleukiner, leukemi inhibitorisk faktor (LIF) cyklisk adenosinmonofosfat (cAMP), forskolin, tetanustoksin, høye nivåer av kalsium (høy K^+), amfiregulin, transformerende vekstfaktor-alfa (TGF- α), transformerende vekstfaktor beta (TGF- β), insulin-lignende

35

vekstfaktorer, deksametason (glukokortikoid hormon), isobutyl 3-metyl xanthin (IBMX), somatostatin, vekst hormon, retinsyre og blodplate-avledet vekstfaktor (PDGF). Disse og andre vekstfaktorer og molekyler vil anvendes i foreliggende oppfinnelse.

5

Eksempler

EKSEMPEL 1

10

PROPAGERING AV FORLØPERCELLER

Embryonisk dag 14 (E14) CD₁ albinomus (Charles River) ble avlivet og hjernen og striata ble fjernet ved anvendelse av steril prosedyre. Vevet ble mekanisk dissosiert med en ild-polert Pasteur pipette inn i serum-fritt medium bestående av en 1:1 blanding av Dulbeccos modifiserte Eagle medium (DMEM) og F-12 næringsblanding (Gibco).

15

Cellene ble sentrifugert ved 800 rpm i 5 minutter, supernatanten ble sugd av og cellene resuspendert i DMEM/F-12 medium for opptelling.

20

Cellene ble suspendert i et serum-fritt medium, referert til som "fullstendig medium", bestående av DMEM/F-12 (1:1) som innbefatter glukose (0.6%), glutamin (2 mM), natriumbikarbonat (3 mM), HEPES (4-[2-hydroksyetyl]-1-piperazinetsulfonsyre) buffer (5 mM) og en definert hormonblanding og en saltblanding (for å erstatte serum) som innbefatter insulin (25 µg/ml), transferrin (100 µg/ml), progesteron (20 nM), putrescin (60 µM) og seleniumklorid (30 nM) (alle fra Sigma med unntagelse av glutamin (Gibco)). I tillegg inneholder mediet 16-20 ng/ml EGF (renset fra muse

25

submaxillary, Collaborative Research) eller TGF_β (human rekombinant, Gibco). Cellene ble sådd ut ved 0.2×10^6 celler/ml inn i 75 cm² vevskulturflasker (Corning) med ikke-substrat forbehandling og hensatt i en inkubator ved 37°C, 100% luftfuktighet, 95% luft/5% CO₂.

30

Når cellene ble proliferert, i løpet av de første 48 timene og innen 3-4 dager in vitro (DIV), dannet de små sammenhopninger, kjent som neurosfærer, som ble løftet av substratet mellom 4-6 DIV.

35

Etter 7 DIV, ble neurosfærene fjernet, sentrifugert ved 400 rpm i 2-5 minutter og pelleten ble mekanisk dissosiert til individuelle celler med en flammebehandlet glasspasteur pipette i 2 ml fullstendig medium.

1 x 10⁶ celler ble på ny sådd ut i en 75 cm² vevskulturflaske med 20 ml EGF-inneholdende fullstendig medium. Proliferasjonen av stamcellene og dannelse av nye neurosfærer ble initiert på nytt. Denne prosedyren kan bli gjentatt hver 6-8 dag.

5

EKSEMPEL 2**DIFFERENSIERING AV NEUROSFÆRER**

Neurosfærer ble differensiert ved anvendelse av følgende metoder. Neurosfærene anvendt for hver metode ble dannet som beskrevet i eksempel 1. Alle neurosfærene som ble anvendt ble passert minst en gang før differensieringen.

10

Paradigma 1 -- Hurtig differensiering av neurosfærer Seks eller åtte dager etter den første passeringen ble neurosfærene fjernet og sentrifugert ved 400 rpm. EGF-inneholdende supernatant ble fjernet og pelleten suspendert i EGF-fritt fullstendig medium inneholdende 1% føtalt bovint serum (FBS).

15

Neurosfærer (omtrent 0.5-1.0 x 10⁶ celler/brønn) ble sådd ut på poly-L-ornithin-belagte (15 µl/ml) dekkglass i 24 brønn Nuclon (1.0 ml/brønn) kulturskåler. Etter 24 timer i kultur ble dekkglassene overført til 12 brønn (Costar) kulturskåler inneholdende fullstendig medium inneholdende 0,5% FBS. Mediet ble skiftet hver 4-7 dag. Denne differensieringsprosedyren blir referert til som "hurtig differensieringsparadigma" eller RDP.

20

Paradigma 2 -- Differensiering av dissosierte neurosfærer

Seks til åtte dager etter den første passeringen ble neurosfærene fjernet og sentrifugert ved 400 rpm. EGF-inneholdende medium ble fjernet og pelleten ble suspendert i EGF-fritt fullstendig medium inneholdende 1% FBS. Neurosfærene ble mekanisk dissosiert til enkelt celler med en flammebehandlet Pasteur pipette og sentrifugert ved 800 rpm i 5 minutter. Mellom 0,5 x 10⁶ og 1.0 x 10⁶ celler ble sådd ut på poly-L-ornithin-belagte (15 µg/ml) dekkglass i 24 brønn Nuclon (1,0 ml/brønn) kulturskåler. EGF-fritt kulturmedium inneholdende 1% FBS ble skiftet hver 4-7 dag.

25

30

Paradigma 3 -- Differensiering av enkelt neurosfærer

Neurosfærer ble vasket fri for EGF ved serieoverføringer gjennom utskifting av EGF-fritt medium. En enkelt neurosfære ble sådd ut på poly-L-ornithin-belagte (15 µg/ml) dekkglass i en 24-brønn plate. Kulturmediet som ble anvendt var fullstendig medium med eller uten 1% FBS. Mediet ble skiftet hver 4-7 dag.

35

Paradigma 4 -- Differensiering av enkelt dissosierte neurosfærer

Neurosfærer ble vasket fri for EGF ved serieoverføringer gjennom utskifting av EGF-fritt medium. En enkelt neurosfære ble mekanisk dissosiert i et 0,5 ml Eppendorf sentrifugerør og alle celleene ble sådd ut på en 35 mm kulturskål. Fullstendig medium ble anvendt med eller uten 1% FBS.

EKSEMPEL 3**VIRKNING AV VEKSTFAKTORER PÅ NEUROSFÆRE DIFFERENSIERING**

10 Virkninger av CNTF, bFGF, BDNF og retinsyre på neurosfære differensiering ble testet ved anvendelse av differensieringsparadigmene angitt i eksempel 2.

CNTF

15 Virkningen av CNTF ble analysert i paradigmene 1 og 3. For begge paradigmene ble CNTF tilsatt enten ved begynnelsen av eksperimentet i en konsentrasjon på 10 ng/ml eller daglig i en konsentrasjon på 1 ng/ml.

I paradigma 1 økte tilsetningen av CNTF antall neuron-spesifikke enolase (NSE)-
20 immunreaktive celler i tillegg til antallet tau-1 immunreaktive celler og dette tyder på at CNTF har en virkning på proliferasjonen, overlevelsen eller differensieringen av neuroner. Preliminær testing med antistoffer som gjenkjenner neurotransmitterne GABA og forbindelse P tyder på at det ikke er noen økning i antall celler som inneholder disse proteinene. Dette tyder på at en annen neuronal fenotype blir produsert.

25 Tre forskjellige antistoffer rettet mot O4, galaktoserebrosid (GalC) og myelinbasisk protein (MBP) ble anvendt for å studere virkningen av CNTF på oligodendrocytter ifølge paradigma 1. CNTF hadde ingen virkning på antall O4 (+) celler, men det var en økning i antallet GalC(+) og MBP(+) celler sammenlignet med kontrollen. Det ser
30 derfor ut som om CNTF spiller en rolle i modningen av oligodendrocytter.

I et eksperiment ble neurosfærene differensiert som vist i paradigma 1 med unntagelse av at serum aldri ble tilsatt til kulturmediet. I den virkningen av CNTF på neuroner og oligodendrocytter ikke var så tydelig som i nærvær av serum, var det en økning i
35 proliferasjonen på flate, protoplasmiske astrocytter. CNTF vil derfor påvirke astrocytt differensieringen ved forskjellige kulturbetingelser.

I paradigma 3 resulterte tilsetning av CNTF i en økning i antallet NSE(+) celler.

BDNF

5 Virkningen av BDNF ble testet ved anvendelse av paradigma 3. Det var en økning i antallet NSE(+) neuroner pr. neurosfære. Det var i tillegg en økning i neuronal forgrening og migrering av neuroner bort fra sfæren.

bFGF

10 Virkningen av bFGF ble testet ved anvendelse av paradigma 2 og 4. I paradigma 2 ble 20 ng/ml bFGF tilsatt ved begynnelsen av eksperimentet og cellene ble farget 7 dager senere. bFGF økte antallet GFAP(+) celler og antallet NSE(+) celler. Dette tyder på at bFGF har en proliferativ eller overlevende virkning på neuroner og astrocytter.

15 I paradigma 4 ble 20 ng/ml bFGF tilsatt ved begynnelsen av eksperimentet og analysert 7-10 dager senere. bFGF induserte proliferasjonen til forløpercellene dannet av EGF-responsive stamceller. Det induserte to forskjellige celletyper slik at de delte seg, neuroblaster og biopotensielle forløperceller. Neuroblasten produserte i gjennomsnitt 6 neuroner, mens biopotensielle celler produserte omtrent 6 neuroner og et antall astrocytter.

20

I tidligere studier ble det oppdaget at ved utsåing ved lav tetthet (2500 celler/cm²) kunne tilsetning av EGF opp til 7 dager in vitro (DIV) initiere proliferasjonen av stamcellen, men ikke dersom applisert etter 7 DIV. Striatlceller (E14, 2500 celler/cm²) ble sådd ut i fravær eller nærvær av 20 ng/ml bFGF. Etter 11 DIV ble kulturene vasket og medium inneholdende 20 ng/ml EGF ble tilsatt. Etter 4-5 DIV i kulturer som ble primet med bFGF inneholdt mer enn 70% av brønnene som ble undersøkt sammenhopninger av prolifererende celler som ble dannet til kolonier med morfologiske og antigene egenskaper som EGF-dannede celler. Kulturer som ikke var blitt primet med bFGF viste ingen EGF-responsiv proliferasjon. Disse funnene tyder på at EGF-responsive stamceller har bFGF reseptorer som regulerer langtidsoverlevelsen.

30

Retinsyre

35 Virkningen av retinsyre ved 10⁻⁷M ble testet ved anvendelse av paradigma 1. Det var en økning i antallet NSE(+) og tau-1(+) celler som tyder på at retinsyre øker antallet neuroner.

EKSEMPEL 4**SCREENING FOR trkB RESEPTOR PÅ NEURALE STAMCELLER**

Ekspresjon av trk-familien av neutrotrofinreseptorer i EGF-dannede neurosfærer ble undersøkt ved Northern blot analyser. Totalt mRNA ble isolert fra mus og rotte striatal

5 EGF-dannede neurosfærer. Både rotte og muse neurosfærer uttrykte høye nivåer av trkB reseptor mRNA, men uttrykte ikke trk eller trkC mRNA. I preliminare eksperimenter ble enkelte EGF-dannede muse neurosfærer sådd ut på poly-L-ornithin belagte dekkglass og dyrket i fravær eller nærvær av 10 ng/ml BDNF. Når undersøkt etter 14-28

10 dager in vitro inneholdt neurosfærer sådd ut i nærvær av BDNF NSE(+) celler med omfattende og sterkt forgrenede utløpere; godt utviklede NSE(+) celler ble ikke observert i fravær av BDNF. Aktivering av trkB reseptoren på EGF-dannede neurosfærer kan forsterke differensieringen, overlevelsen av og/eller neuritt utveksten fra nettopp dannede neuroner.

15

EKSEMPEL 5**SCREENING FOR GAP-43 MEMBRAN FOSFOPROTEIN PÅ NAURALSTAMCELLER**

Vekst-assosiert protein (GAP-43) er et nervesystem-spesifikt membran fosfoprotein som er nedregulert i løpet av utviklingen. GAP-43 var antatt å være neuron-spesifikk,

20 men rapporter viser at dette proteinet kan bli minst forbigående uttrykt i løpet av utviklingen i noen astrocytter, oligodendrocytter og i Schwann-celler. For tiden er rollen til GAP-43 i makroglia ikke kjent. Forbigående ekspresjon av GAP-43 i gliaceller dannet fra EGF-responsive stamceller som stammer fra embryoniske og voksne murine striatum ble undersøkt. Gliacelle (astrocytt og oligodendrocytt) differensiering ble

25 indusert ved utsåing av forløper celler i et medium inneholdende 1% FBS uten EGF. Cellene ble deretter probet med spesifikke antistoffer for GAP-43, nestin, GFAP, O4 og GalC. For å identifisere celler som uttrykker GAP-43 ble antistoffene slått sammen i forskjellige kombinasjoner ved anvendelse av dobbeltmarkør immunfluorescens metoder.

30

I løpet av de første to dagene etter utsåing var det et lavt til moderat nivå av GAP-43 ekspresjon i nesten alle celler (flat, bipolar og stellat), men innen 3-4 dager etter utsåing var nivået av GAP-43 ekspresjonen begrenset til bipolare og stellate celler. Ved 4 dager var hoveddelen av GAP-43-uttrykkende celler dobbeltmerket med

35 oligodendrocyttmarkørene O4 og GalC til tross for at GFAP og GAP-43 ble ko-uttrykt i et antall celler. En uke etter utsåing uttrykte nesten alle GFAP-uttrykkende astrocytter ikke lenger GAP-43, mens de fleste O4 og GalC-uttrykkende celler fortsatte å uttrykke

GAP-43. Ved 7-10 dager begynte disse oligodendrocyttene å uttrykke MBP og miste ekspresjon av GAP-43. EGF-responsive stamceller kan representere et nyttig modellsystem for studering av rollen til GAP-43 i glial og neural utvikling.

Patentkrav

1.

5 Fremgangsmåte for fremstilling av differensierte celler fra pattedyrnervestamceller, karakterisert ved at den omfatter trinnene:

- 10 (a) proliferering av minst en pattedyrnervestamcelle, isolert fra donorvev hvor vevet ikke stammer fra et humant embryo, i suspensjon i et serumfritt kulturmedium omfattende EGF som et mitogen som prolifererer nevnte minst en stamcelle for å produsere neurale forløperceller, hvor minst en neural stamcelle responderer på EGF og er i stand til å produsere etterkommere som er i stand til å differensiere til neuroner, astrocytter og oligodendrocytter; og
- 15 (b) differensiering av de neurale forløperceller ved å fjerne mitogenet og dyrking av nevnte neurale forløperceller i et EGF-fritt differensieringsinduserende kulturmedium for å produsere differensierte celler, hvor nevnte medium inneholder et substrat til hvilket de neurale forløperceller kan feste seg, hvor nevnte medium inneholder en eksogen vekstfaktor valgt fra gruppen bestående av CNTF, bFGF, BDNF og
- 20 retinsyre.

2.

25 Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at substratet er valgt fra gruppen bestående av poly-L-ornitin, kollagen, fibronectin, laminin og matrigel.

3.

30 Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, karakterisert ved at de nevnte differensierte cellene er neuroner.

4.

35 Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, karakterisert ved at de nevnte differensierte cellene er modne oligodendrocytter.

5.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at de nevnte differensierte celler er astrocytter.

5

10